

**Deteksi *Nervous Necrosis Virus* (NNV) Bagian 2 :
Metode *Quantitative (real-time) one step Reverse
Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-
qPCR) menggunakan
*Hydrolysis Probe***



© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar Isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1. Ruang lingkup.....	1
2. Istilah dan definisi	1
3. Prinsip umum.....	2
4. Peralatan	2
5. Bahan	3
6. Prosedur	3
7. Interpretasi hasil	6
8. Jaminan mutu	8
Bibliografi.....	10
Lampiran A (normatif) Sekuen DNA fragmen gen CP NNV (Gen Bank Acc.no. D38636) Plasmid Standar NNV (Panzarin et al., 2010).....	9

Prakata

Dalam upaya pencegahan penyebaran penyakit HPI/HPIK dengan cara mendeteksi penyakit virus dengan cepat, tepat dan akurat maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Deteksi *Nervous Necrosis Virus* (NNV) Bagian 2 : Metode *Quantitative (Real-Time) one step reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) menggunakan *Hydrolysis Probe*.

Standar ini merupakan revisi dari SNI 7546:2009 dengan memperhatikan keterbaruan perkembangan teknologi dalam identifikasi dan deteksi NNV, dengan perubahan pada prinsip umum, peralatan dan bahan, serta prosedur. Standar ini merupakan salah satu bagian dari standar seri untuk deteksi NNV, pemisahan bagian didasarkan pada teknologi yang digunakan di laboratorium uji.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis (PT) 65-07 Perikanan Budidaya dan dibahas dalam rapat konsensus pada tanggal 22 – 25 Juni 2014 di Bogor yang dihadiri oleh anggota panitia teknis, unsur pemerintah, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya dengan memperhatikan:

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
5. Keputusan Menteri Kelautan Perikanan Nomor 26/Kepmen-KP/2013 tentang Penetapan Jenis-Jenis Hama Penyakit Ikan Karantina (HPIK), Media Pembawa, Golongan dan Sebaranya
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.

Standar ini telah dilakukan jajak pendapat pada tanggal 30 Agustus 2014 sampai dengan 29 Oktober 2014 dengan hasil akhir RASNI.

Deteksi
Nervous Necrosis Virus (NNV) Bagian 2:
Metode *Quantitative (real-time) one step Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)* menggunakan *Hydrolysis Probe*

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *nervous necrosis virus* (NNV) dengan metode *quantitative (real-time) one step reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-qPCR) menggunakan *hydrolysis probe*.

2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dalam dokumen ini, istilah dan definisi berikut digunakan

2.1

amplifikasi

proses penggandaan asam deoksiribonukleat (DNA) secara *in vitro*

2.2

annealing

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

2.3

alikuot

pembagian menjadi beberapa ukuran yang lebih kecil agar memudahkan pemakaian dan mencegah dari kemungkinan kontaminasi

2.4

Cq (cycle quantification)/ Ct (cycle threshold)/ Cp (crossing point)

titik perpotongan antara kurva amplifikasi kontrol negatif dengan sampel atau titik awal terjadinya kenaikan kurva amplifikasi

2.5

denaturasi

proses pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal

2.6

ekstensi

proses pemanjangan untai DNA baru yang komplemen terhadap DNA target dengan bantuan enzim DNA *polymerase*, sehingga akan terbentuk 2 buah DNA untai ganda

2.7

ekstraksi RNA

pemisahan bahan genetik/ asam nukleat (RNA) dari sampel

2.8

hydrolysis probe

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang dilabel dengan sebuah *fluorophore* secara kovalen pada ujung 5' dan sebuah *quencher* pada ujung 3' yang akan berpendar ketika terjadi proses amplifikasi.

2.9

kurva standar

kurva yang dibuat dari sederetan larutan standar yang masih dalam batas linieritas sehingga dapat diregresilinierkan

2.10

kontrol negatif amplifikasi

nuclease-free water yang diperlakukan sama dengan hasil ekstraksi contoh uji

2.11

kontrol negatif ekstraksi

hasil ekstraksi yang berasal dari *nuclease-free water*

2.12

kontrol positif ekstraksi

hasil ekstraksi yang berasal dari organ yang terinfeksi

2.13

kontrol positif amplifikasi

RNA virus atau hasil transkripsi *in vitro* dari potongan genom virus

2.14

koktail

larutan yang berisi berbagai komponen untuk proses amplifikasi

2.15

Limit of Detection (LOD)

jumlah *copy* atau molekul target terendah yang masih dapat dideteksi dengan tingkat kepercayaan 95%

2.16

primer

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

2.17

real-time PCR

suatu teknik PCR dengan metode analisa yang secara simultan dapat diamati hasil amplifikasinya

2.18

Reverse Transcription (RT)

proses pembentukan DNA komplemen (cDNA) dari RNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase*

2.19

standar positif

plasmid yang mengandung cDNA virus yang diketahui jumlah copynya

2.20

TaqMan probe

probe hidrolisis yang dirancang untuk meningkatkan spesifisitas PCR kuantitatif yang mengandung zat warna fluoresens *reporter* disisi 5' dan *quencher* disisi 3'.

2.21**template**

sekuen cDNA/RNA tertentu yang akan diamplifikasi

3 Prinsip umum

Mengekstraksi dan memurnikan RNA dari organ target/jaringan yang diduga terinfeksi NNV, dilanjutkan dengan proses transkripsi balik untuk mensintesis cDNA dan amplifikasi yang berlangsung dalam satu tahap secara *real-time*.

4 Peralatan

- a) mesin *real-time* PCR;
- b) alat pengukur konsentrasi asam nukleat berbasis spektrofotometri;
- c) *freezer* (-20°C atau lebih rendah);
- d) *heating block* atau *waterbath*;
- e) *laminar air flow cabinet*;
- f) *mini mixer*.
- g) mikropipet berbagai ukuran 0,1 µl – 1 000 µl;
- h) pinset dan gunting;
- i) rak blok es;
- j) *refrigerated centrifuge*;
- k) *spindown centrifuge*.

5 Bahan

- a) bufer tris EDTA (TE) (konsentrasi 10 mM Tris HCl 1 mM EDTA pH 7,5);
- b) *diethyl pyro carbonate* (DEPC)- *treated water* atau *RNase/nuclease-free water*;
- c) etanol *p.a*;
- d) *filtered microtip* berbagai ukuran 10 µl – 1 000 µl ;
- e) isopropanol (2-propanol);
- f) kloroform;
- g) *kit real-time* PCR komersial kompatibel dengan *TaqMan probe*;
- h) larutan ekstraksi RNA komersial;
- i) larutan penghambat *RNase*;
- j) masker;
- k) penggerus jaringan (*pellet pestle*);
- l) plasmid standar positif NNV;
- m) sarung tangan (*powder-free*);
- n) 1 set primer dan *probe* (Panzarin *et al.*, 2010);
 - Primer *forward* NNV : 5'-CAACTGACARCGAHCACAC 3'
 - Primer *Reverse* NNV : 5'-CCCACCAATTGGCVAC 3'
 - RNA2 *probe* NNV : 5'-FAM-TYCARGCRACTCGTGGTGCVG-BHQ1 3'
- o) tabung mikro ukuran 0,2 ml; 1,5 ml – 2 ml;
- p) tabung atau *microplate* PCR optikal ukuran 0,1 ml - 0,2 ml atau tabung kapiler ukuran 20 µl - 100 µl.

CATATAN Bahan disesuaikan dengan metode standar yang digunakan

6 Prosedur

6.1 Persiapan contoh uji

- Telur dan ikan ukuran kecil (kurang dari 1 cm)
Contoh uji diambil secara utuh.
- Ikan ukuran sedang (ukuran 1 cm – 6 cm)
Contoh uji dapat diambil dari bagian kepala
- Ikan ukuran besar (ukuran lebih dari 6 cm)
Contoh uji dapat diambil dari organ mata dan otak baik segar maupun beku (-20 °C) atau yang sudah diawetkan dalam larutan preservatif RNA.

6.2 Ekstraksi RNA¹

- masukkan 20 mg contoh uji ke dalam tabung mikro 1,5 ml.
- tambahkan 500 µl larutan kit ekstraksi RNA komersial, homogenkan menggunakan penggerus pelet.
- inkubasikan selama 5 menit pada suhu ruang.
- tambahkan 100 µl kloroform.
- tutup tabung mikro dan kocok dengan *mini mixer* selama 15 detik dan inkubasikan pada suhu ruang selama 3 menit.
- sentrifugasi contoh uji pada 13 000 x *g* selama 15 menit.
- pindahkan cairan lapisan paling atas ke dalam tabung mikro baru.
- tambahkan isopropanol sebanyak 200 µl.
- sentrifugasi pada 13 000 x *g* selama 10 menit.
- uang *supernatant*, cuci pelet dengan 750 µl etanol 75%, sentrifugasi pada 7 500 x *g* selama 5 menit.
- keringanginkan pelet RNA selama 10 menit.
- larutkan pelet RNA dengan 100 µl DEPC- *treated water*.
- simpan larutan RNA pada -20 °C apabila segera digunakan dan untuk penyimpanan lebih lama pada *freezer* dengan suhu yang lebih rendah (< -40 °C) dalam bentuk alikuot.

6.3 Amplifikasi

- cairkan RNA template, RT *master mix probe*, primer, *probe*, enzim RT-PCR, RNase-free *water* dengan meletakkan di atas rak blok es
- buat preparasi koktail sesuai dengan Tabel 1. Siapkan volume koktail 10% lebih banyak dari yang dibutuhkan. Contoh uji yang dianalisa duplo minimal 5% dari total contoh uji.

Tabel 1 Komposisi koktail untuk RT-qPCR

No.	Komponen	Volume/reaksi (µl)	Konsentrasi akhir
1.	RT PCR Master Mix	12,5	1 x
2.	Primer <i>Forward</i> (20 µM)	0,5	0,4 µM
3.	Primer <i>Reverse</i> (20 µM)	0,5	0,4 µM
4.	Probe (10 µM)	0,25	0,1 µM
5.	Enzim <i>Reverse Transcriptase</i>	0,25	0,1 unit

¹ prosedur metode ekstraksi RNA disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan kompatibel dengan bahan amplifikasi yang sudah divalidasi.

No.	Komponen	Volume/reaksi (µl)	Konsentrasi akhir
6.	RNase free water	9	-
7.	Template RNA	2	0,4 ng – 4 ng
	Total Volume	25	-
CATATAN komposisi koktail disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan sudah divalidasi			

- c) homogenkan semua bahan *koktail* dan distribusikan ke masing-masing tabung/*plate* PCR optikal. Masukkan 2 µl *template* RNA (10 ng - 100 ng) contoh uji, kontrol positif ekstraksi; kontrol negatif ekstraksi, kontrol positif amplifikasi (RNA); kontrol negatif amplifikasi (NTC); dan 4 standar positif (10 *copies*; 10² *copies*; 10³ *copies*; 10⁴ *copies*).
- d) lakukan amplifikasi dengan real time PCR, dengan kondisi sesuai Tabel 2.

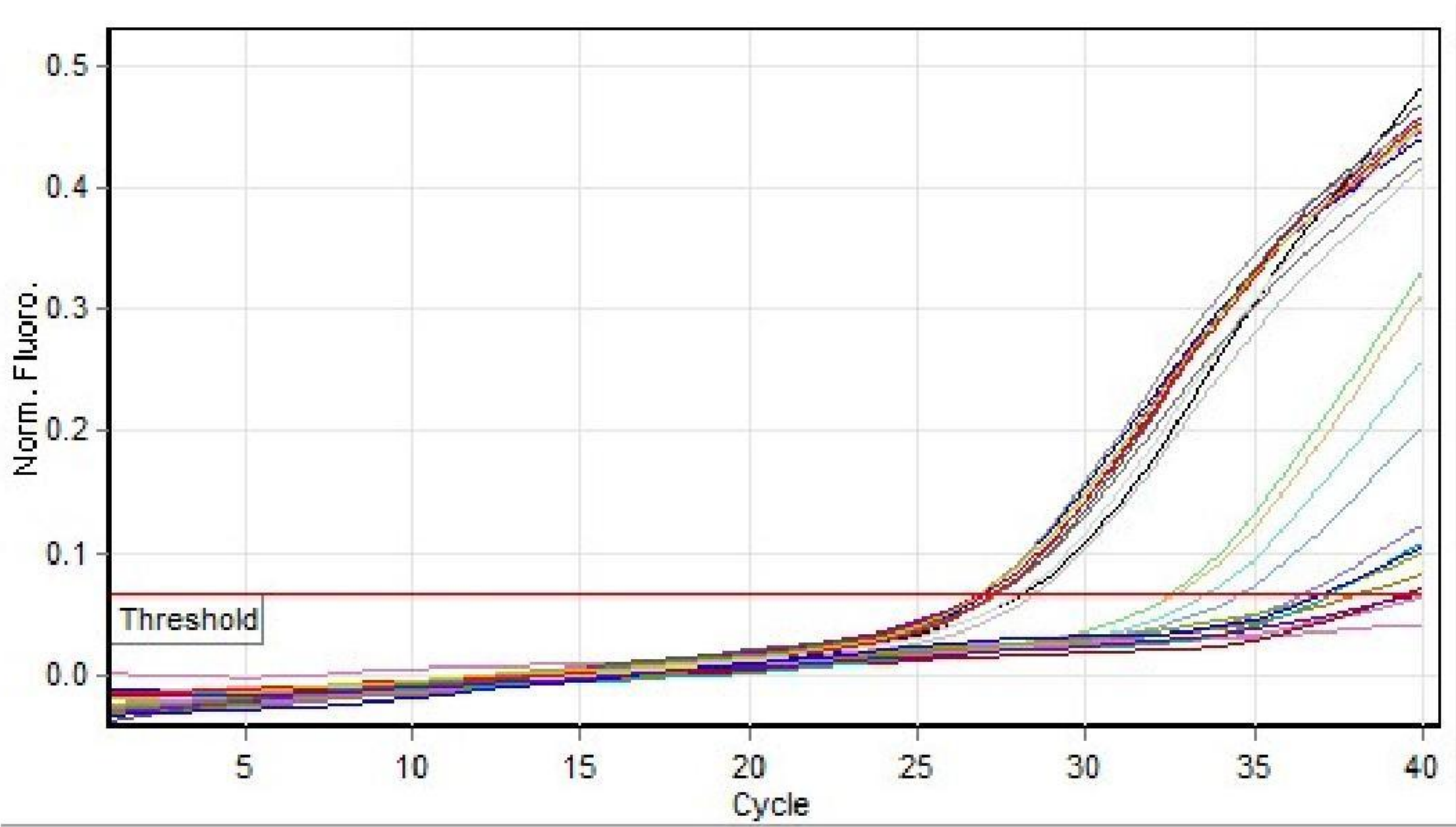
Tabel 2 Profil Amplifikasi

Proses	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
<i>Reverse Transcription</i>	50	30 menit	-
<i>PCR initial Activation</i>	95	15 menit	-
<i>Denaturasi</i>	95	15 detik	40
<i>Annealing/extention</i>	55	45 detik	
CATATAN profil amplifikasi disesuaikan dengan bahan amplifikasi yang digunakan dan mesin <i>real time</i> PCR yang digunakan			

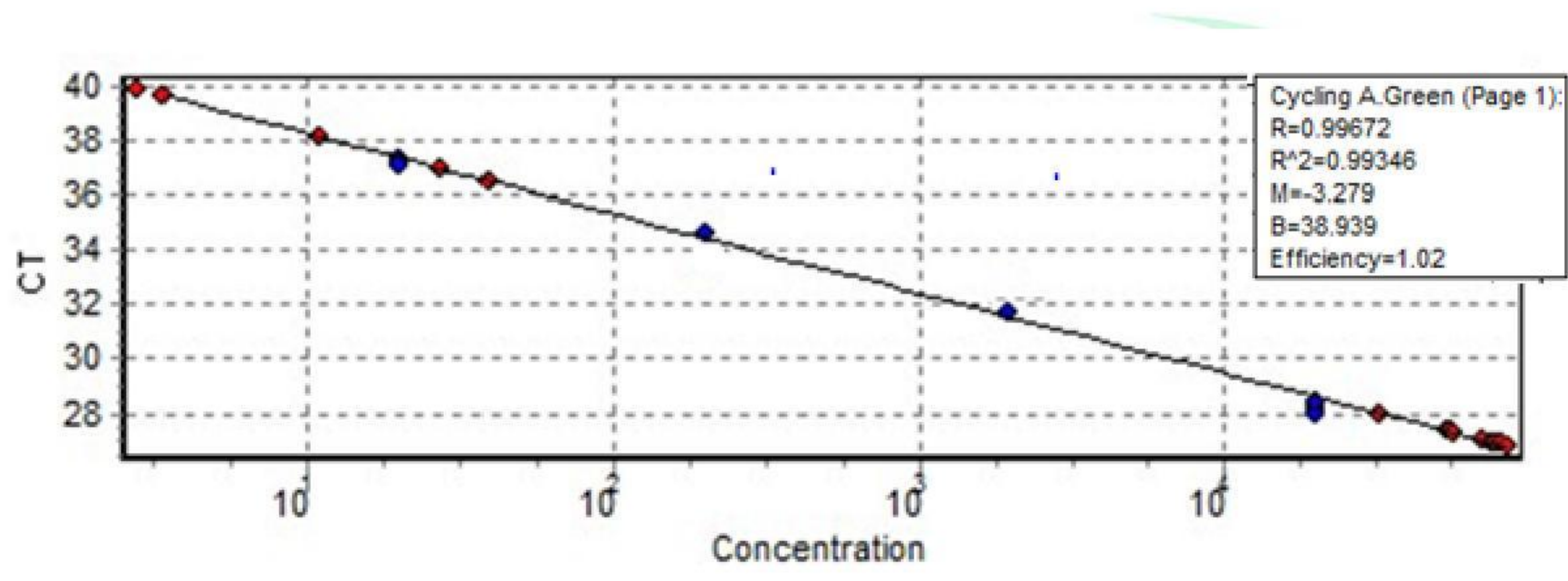
7 Interpretasi hasil

Analisa data sesuai dengan *software real-time PCR* yang digunakan.

- a) Pengamatan setelah analisa data amplifikasi :
Interpretasi kurva *amplifikasi* adalah sebagai berikut:
- contoh uji dinyatakan positif apabila terlihat naiknya kurva di atas garis *threshold/cut off* dan nilai Ct lebih kecil atau sama dengan LOD.
 - semakin cepat naik/munculnya kurva dan memotong garis *threshold/cut off* menunjukkan jumlah *copy* virus yang semakin banyak (konsentrasinya tinggi)
 - contoh uji dinyatakan negatif apabila berada di bawah garis *threshold/cut off* dan nilai Ct lebih besar dari LOD dengan tingkat kepercayaan (*confident level*) 95%.
- b) Kuantifikasi *copy* virus
- Jumlah *copy* virus dapat dilihat pada tabel laporan kuantifikasi di perangkat lunak komputer yang terhubung dengan mesin *real-time* PCR yang digunakan.
 - Berdasarkan tabel 3 dapat dianalisis sebagai berikut :
 - 1) Contoh uji dinyatakan positif apabila konsentrasi sama atau lebih dari nilai LOD 10 *copies* (*a1* dan *a2*, *c1* dan *c2*, *d1* dan *d2*)
 - 2) contoh uji dinyatakan negatif apabila nilai konsentrasi kurang dari nilai LOD 10 *copies* (*b1* dan *b2*,).



Kurva standar



Gambar 1 – Kurva standar

Tabel 3 Keterangan gambar hasil amplifikasi real time

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
1		Standar VNN 10 ⁴	Standard	28.15	10,000.0	17,547.3	37.5%
2		Standar VNN 10 ⁴	Standard	28.48	10,000.0	13,406.6	34.1%
3		Standar VNN 10 ³	Standard	32.67	1,000.0	932.0	10.8%
4		Standar VNN 10 ³	Standard	32.53	1,000.0	983.4	11.7%
5		Standar VNN 10 ²	Standard	34.63	100.0	96.4	9.6. %
6		Standar VNN 10 ²	Standard	34.59	100.0	89.7	10.3%
7		Standar VNN 10 ¹	Standard	37.27	10.0	10.0	0.4%
8		Standar VNN 10 ¹	Standard	37.09	10.0	11.6	16.0%
9		contoh uji a1	Unknown	36.48		19.0	
10		contoh uji a2	Unknown	36.95		12.9	
11		contoh uji b1	Unknown	39.59		1.5	
12		contoh uji b2	Unknown	38.10		5.1	
13		contoh uji c1	Unknown	26.86		50,329.0	
14		contoh uji c2	Unknown	26.92		48,074.3	
15		contoh uji d1	Unknown	27.37		33,098.8	
16		contoh uji d2	Unknown	27.34		33,923.9	
17		NTC Ekstraksi 1	NTC				
18		NTC Ekstraksi 2	NTC				
19		NTC Amplifikasi 1	NTC				
20		NTC Amplifikasi 2	NTC				

CATATAN Untuk pembacaan nilai pada software, angka yang menyatakan ribuan dipisahkan dengan tanda koma (,) sedangkan angka desimal dipisahkan dengan tanda titik (.)

8. Jaminan mutu pengujian

- a) proses ekstraksi RNA dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif ekstraksi (PEC) dan kontrol negatif ekstraksi (NEC) dan menunjukkan hasil yang konsisten atau dengan menggunakan *reference gene*.
- b) hasil ekstraksi RNA mempunyai rasio $\text{A}_{260} / \text{A}_{280}$ berkisar 1,8 – 2,1.
- c) proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif amplifikasi (PAC) dan kontrol negatif amplifikasi (NAC) menunjukkan hasil yang konsisten.
- d) efisiensi amplifikasi dinyatakan baik apabila mempunyai nilai 0,9 – 1,1.
- e) proses *real time PCR* valid bila dilihat dari kurva standar dengan nilai koefisien determinasi (R^2) > 0,985.
- f) keterulangan (*Repeatability*) untuk pengujian duplo harus mempunyai nilai standar deviasi (SD) Cq lebih kecil dari 0,5.



**Lampiran A
(Normatif)**
Sekuen DNA fragmen gen CP NNV (Gen Bank Acc.no. D38636)
Plasmid Standar NNV (Panzarin *et al.*, 2010)

Primer CP1 (for) : 5'-CAACTGACAACGATCACACCTTC-3'
Primer CP2 (rev) : 5'-CAATCGAACACTCCAGCGACA-3'
Target sekuen : 230 bp

Primer Real time qPCR NNV (Panzarin *et al.*, 2010)

Primer *forward* NNV : 5'-CAACTGACARCGAHCACAC 3'
Primer *Reverse* NNV : 5'-CCCACCAATTGGCVAC 3'
RNA2 *probe* NNV : 5'-FAM-TYCARGCRACTCGTGGTGCVG-BHQ1 3'

5'-CAACTGACAACGATCACACCTTCGACGCGCTTCAAGCAACTCGTGGTGCAGTCGTTG
CCAAATGGTGGGAAAGCAGAACAGTCCGACCTCAGTACACCCGCACGCTCCTCTGGACCTC
GTCGGGAAAGGAGCAGCGTCTCACGTACCTGGTCGGCTGATACTCCTGTGTGTTGGCAA
CAACTGATGTGGTCAACGTGTCAGTGCTGTGTCGCTGGAGTGTTGATTG-3'

CATATAN Standar positif dapat berasal dari sekuen gen RNA2 NNV yang kompatibel dengan primer dan probe yang digunakan.

Bibliografi

- Panzarin V., Patarnello P., Mori A., Rampazzo E., Cappellosza E., Bovo G., Cattoli G., 2010. Development and validation of a real-time TagMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens.
- IQ-Real2011. Instruction Manual : *Procedure Silica gel*. GeneReach Biotechnology Corp.
- OIE. 2012. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Chapter 2.3.11. *Viral Encephalopathy and Retinopathy*

